

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05789

研究課題名(和文) シジミの貝殻色の決定因子の解明：べっこうシジミはなぜ生じるのか

研究課題名(英文) Clarification of shell color of Corbicula clam: Why do Bekko Shijimis occur.

研究代表者

楠本 邦子(竹本邦子)(Kusumoto (Takemoto), Kuniko)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80281509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：シジミの貝殻の色は、黄色系と黒色系に分けられる。日本の在来種である3種類のシジミについて、貝殻の色が黒色化する原因物質を主に分光法を用い詳細に調べた。その結果、石灰質層の上にある有機物膜(殻皮)に、鉄-ジヒドロキシフェニルアラニン錯体(Fe-DOPA錯体)が形成されることで貝殻が黒くなることを明らかにした。また、Fe-DOPA錯体は、水環境から殻皮に拡散した溶存有機-Fe錯体の配位子交換によって形成されることを明らかにした。これは、生息環境が殻皮の色を決定する重要な要因であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、黄色を帯びた貝殻のシジミは砂地で、黒色を帯びた貝殻のシジミは泥地で育つ傾向にあるという、これまで経験的に知られていた知見に対し、初めて科学的な分析と検討を行ったものである。黒色化の原因物質の同定と形成メカニズムを解明したことで、貝殻の色から、生育環境履歴を読み出すことができるようになる。これにより、シジミの成長に最適な底質環境を明らかにすることが可能となり、資源復活への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：The shell color of Corbicula clams is roughly divided into yellowish and blackish. To elucidate the origin of the blackening substance of the shell, analysis of the shells of three native Japanese Corbicula species were conducted using X-ray absorption fine structure spectroscopy, Raman spectroscopy, and attenuated total reflection infrared spectroscopy. We found that the formation of an iron (Fe)-L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) complex in a thin organic layer, called the periostracum, on a calcareous layer causes the blackening of the shell. The results indicate that dissolved Fe-organic complexes diffuse from the aqueous environment to the periostracum, forming Fe-DOPA complex through ligand exchange. Our findings show that the water environment in which Corbicula clams live may be a significant factor in determining shell color.

研究分野：X線分析

キーワード：Corbicula 殻皮 Fe-DOPA錯体 黒色化 ラマン分光法 X線微細構造 配位子交換

1. 研究開始当初の背景

淡水域や汽水域に生息するシジミは、一般に貝殻の色は黒色であると思われるが、稀に黄色に輝く「べっこうシジミ」と呼ばれるシジミがいる。漁業従事者によると、近年、シジミの漁獲量が激減しただけではなく、かつて砂地で獲れた「べっこうシジミ」も獲れなくなっているという。黄色を帯びたシジミは砂地で、黒色を帯びたシジミは泥地で育つ傾向にあるということが経験的に知られていた。このように、生息環境との相関が強く指摘されているシジミの貝殻の色であるが、科学的な分析や検討が行われたことはほとんどなかった。

二枚貝の貝殻は、卵内成分からなる幼生殻と、摂餌を開始後、湖由来の成分を取り込み外套膜上皮からの代謝物により形成される殻で構成されている(図2)。このため、貝殻は幼生殻を起点とする年輪のような成長線を有した構造をとる(図3)。貝殻は、炭酸カルシウムと複合タンパク質からなる石灰質層と殻皮と呼ばれる有機皮膜からなる。同じ代謝物からできているにも関わらず殻皮の色は黄色、褐色、黒色と多様で、成長線毎に色が異なるシジミも存在する。申請者は、殻皮生成時に底質環境の違いによりなにかの「シグナル」が発生し、殻皮の色が決定されるのではないかと考えた。そこで着目したのが、メラニン色素である。メラニンには、ユーメラニンという褐色から黒色を発現するものと、フェオメラニンという黄色から赤色を発現するものがある。メラニンは、フェオメラニンとユーメラニンの割合により様々な色を呈する。メラニンは、アミノ酸の一種であるチロシンを出発物質として、さまざまな酸化反応を経て生じた化合物が重合した高分子有色物質である。ドーパキノンが環化すると黒色や褐色のユーメラニンの合成経路への移行が確定し、チオール結合が起ると黄色のフェオメラニン合成への移行が確定する。ドーパキノンへのシステイン結合は速やかに進行することが知られており、システイン濃度が1 μM 以下になるまで環化は進行しない。システインはタンパク質の構成成分として立体構造を維持する重要なアミノ酸であると共に、酸化還元反応による生体成分の代謝を進めるなど生理的にも重要なアミノ酸である。申請者は、底質環境の違いが、システインの生成に影響を与え、結果として、殻皮の色に影響を与えているのではないかと考えた。

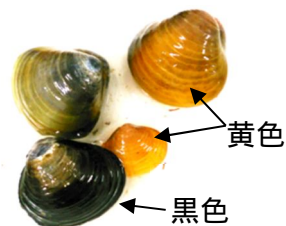


図1 琵琶湖産シジミ

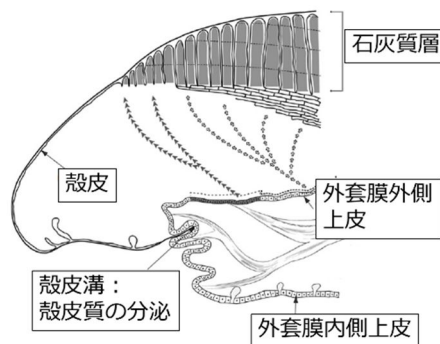


図2 貝殻の腹縁の断面の模式図
F. Marin, et al., Curr. Top. Dev. Biol., 80 (2008) 209-276. 改編

2. 研究の目的

本研究では、シジミの貝殻の色を決める因子を見つけ出し、色が決定されるメカニズムを明らかにすることを目的とする。主に琵琶湖に生息するシジミの貝殻の最表層にある殻皮に含まれる色素について、非破壊分析法であるX線吸収微細構造解析(XAFS)で構造推定を行い、シジミの貝殻の色を決定する原因物質を明らかにする。この結果をもとに、シジミの貝殻の色が決まるメカニズムを解明するとともに、良質なシジミが成長できる底質環境を明らかにする。

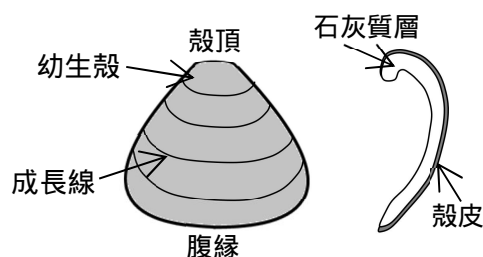


図3 二枚貝の貝殻の模式図

3. 研究の方法

(1) 試料調整

琵琶湖で採取された生きたセタシジミ (*Corbicula sandai*) は、瀬田町漁業組合または地元市場で購入した。瀬田川で採取された生きたマシジミ (*C. leana*) は、瀬田町漁業組合で購入した。穴道湖で採取された生きたヤマトシジミは、(*C. japonica*) は大阪の店舗で購入した。

貝殻は軟体部を除去した後、風乾し、黒色を帯びた貝殻(黒色タイプ)と黄色を帯びた貝殻(黒色タイプ)および、黄色と黒の共存する貝殻(縞タイプ)に分け、測定までデシケーターで保管した。種の同定は、除去した軟体部を用いたミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子解析で行った。

殻皮表面のX線吸収微細構造(XAFS)とラマン分光分析は、未処理の貝殻を試料として用いた。深さ方向のラマン分光および電子プローブマイクロアナライザー(EPMA)分析用に断面試料を準備した。貝殻を樹脂に包埋し、最大成長軸に沿って殻頂から腹縁で切り出し、断面を鏡面研

磨した。鏡面研磨後、表面に炭素蒸着を行い、EPMA 測定用の試料を作製した。EPMA 分析後、断面を再研磨し、ラマン測定用試料を作製した。

赤外吸収分光(IR)分析用に、殻皮の自己支持膜を作成した。自己支持膜は、6N 塩酸を用いた。石灰質層のみを酸処理する場合は、貝殻の殻皮側をパラフィルムで覆い酸化処理を行った。処理後、殻皮を蒸留水で洗い、風乾した。

(1) EPMA

Fe, Mn, Ca の元素分布 (元素マッピング) を貝殻の断面にわたって分析した。Fe と Mn の分布は EPMA を用いて検出した。Ca の分布はエネルギー分散型分光計(EDS)を用いて検出した。EPMA 分析は、走査型電子顕微鏡 (SEM) および波長分散型分光法 (WDS) 分光計を備えた電界放出型 EPMA (FE-EPMA) (JXA-8530F, JEOL) を用いて行った。加速電圧は 15 kV, 試料電流は 30 nA とした。電子ビームサイズは 1.0 μm であった。

(2) マイクロラマン分光法

マイクロラマンスペクトルは、T64000 (HORIBA) と Renishaw inVia Raman spectrometer (Renishaw, Gloucestershire, UK) を用いて行った。T64000 の光源はアルゴンイオンレーザーの 514nm ライン, 出力 4 mW である。Renishaw inVia Raman spectrometer の光源は 532nm の半導体レーザー, 出力 0.3 mW とした。スポットサイズは共に 1.0 μm であった。

(3) 全反射 IR (ATR-IR)

ATR-IR スペクトルは、PerkinElmer 社のユニバーサル ATR サンプリングアクセサリを装備した Spectrum 65 FT-IR spectrometer (PerkinElmer Co., Ltd., Massachusetts, USA) を用いて、1 cm^{-1} 分解能で収集した。

(4) X 線吸収微細構造(XAFS)

Fe の K 吸収端 XAFS 測定は、あいちシンクロトロン光センター (愛知県瀬戸市) の硬 X 線 XAFS II ビームライン BL11S2 で、7 素子シリコンドリフト検出器を用いた。試料位置でのビームサイズは約 0.40 mm (V) \times 0.30 mm (H) であった。

O の K 吸収端および Fe の L 端 XAFS 測定は、立命館大学 SR センター (滋賀県草津市) の軟 X 線回折ビームライン BL-11 で、部分電子収量法で測定を行った。試料位置でのビームサイズは約 2 mm (水平) \times 3 mm (垂直) であった。

データの解析には、Athena および Artemis ソフトウェアを使用した。

(4) DOPA オキシダーゼ反応試験

シジミを一晩冷蔵 (5 $^{\circ}\text{C}$) し、生きたまま貝殻から軟体部を取り出した。軟体部を pH7.4 の 0.1 M リン酸緩衝液に 0.0056 M の L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) を溶かした溶液に 37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした。DOPA 溶液でインキュベートした後、10% 中性ホルマリンで固定した。コントロールとして、DOPA を含まない溶液でもインキュベートした。

4. 研究成果

当初、殻皮からメラニン色素などの色素物質を抽出し、高速液体クロマトグラフ質量分析計を用い、色素の分析を行う計画であった。しかし、他の貝で行われた方法を参考に様々な方法を試したが、殻皮から色素物質を抽出することができなかった。そこで、計画を変更し、殻皮の黒色化と関連する物質を XAFS で絞り込み、他の非破壊法を組合せ同定する計画に変更した。また、殻皮と灰質層の分析も合わせて行うこととした。また、比較のため、セタシジミとマシジミ、ヤマトシジミの 3 種類の在来種についても対象とすることにした。

(1) 黒色化物質

Fe の K 吸収端 XAFS 解析より、黄色と黒色が、成長線に平行に繰り返される縞状シジミにおいて、黒色部には黄色部より多く Fe が存在していることが分かった (図 4 右)。X 線吸収端近傍構造 (XANES) 解析より、殻皮中の Fe は 3 個で存在していることが分かった (図 4 左)。スペクトルの形状から、FeO や Fe₃O₄ のような黒色の酸化鉄や FeS のような硫化鉄は黒色化の原因物質ではないことが分かった。黒色タイプの広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS) 振動をフーリエ変換して得た動径分布関

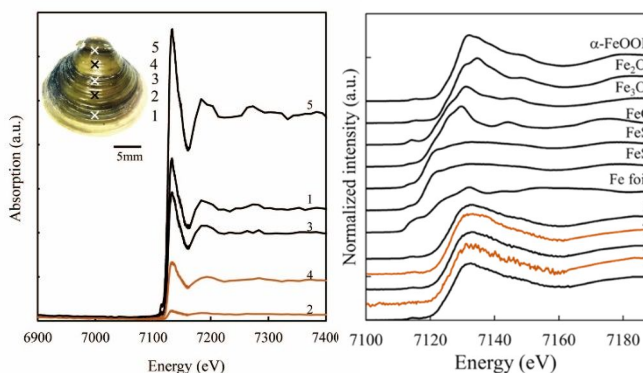


図 4 琵琶湖産シジミと参照試料の Fe の K 吸収端 XAFS スペクトル

数には、Fe-O の第一近接に相当するピークが現れたが、Fe-Fe の第一近接に相当するピークは現れなかった。フィッティングで求めた Fe-O の位相シフト補正後の原子間距離は、約 2.0 Å、配位数は 5.7 ± 0.3 であった。XAFS の結果から、殻皮を黒色化する Fe 化合物は、Fe を中心に 6 個の O が配位した歪んだ FeO_6 八面体構造をもつ鉄錯体であることが分かった。

鉄錯体を同定するため、顕微ラマン分光法を行った。比較のため、黒色タイプの暗褐色部と黒色部と黄色タイプの茶色部と黄色部でラマン分光スペクトルの測定を行った(図 5)。黒色部のラマン散乱強度は最も強く、黄色部は蛍光が強くラマンシグナルは検出されなかった。黒色部のラマンスペクトルには、 1485 cm^{-1} に顕著なピークと、 $540, 588, 630\text{ cm}^{-1}$ および $1270, 1329, 1423\text{ cm}^{-1}$ に特徴的な構造が見られ、黒色化とともにピーク強度が高くなった。 $1270, 1329, 1423, 1485\text{ cm}^{-1}$ のピークはカテコール環振動に由来するバンド、 630 cm^{-1} と 588 cm^{-1} のピークはそれぞれ Fe^{3+} イオンとカテコールの C3 および C4 の O との相互作用に由来するバンドに由来する。 540 cm^{-1} のピークは二座キレート電荷移動相互作用に由来する。これらのバンドは、DOPA-金属錯体の指標として用いられる。黒色部のスペクトルは、ムール貝 (*Mytilus*) の DOPA 含有粘着タンパク質と結合した Fe-DOPA 錯体のスペクトルと非常に似ていた。この結果から、黒色部に Fe-DOPA 錯体が存在していることがわかった。なお、当初予想していたユーメラニンのスペクトルは黒色化と相関は認められなかった(図 5)。

ラマン分光の結果から、黒色部に存在していた鉄錯体は、Fe にベンゼン環のオルト位に 2 個の水酸基が結合したカテコール基が結合した Fe-DOPA 錯体であることがわかった(図 6)。XAFS の結果からこのカテコール鉄錯体の多くはトリス体を取っていることがわかった。

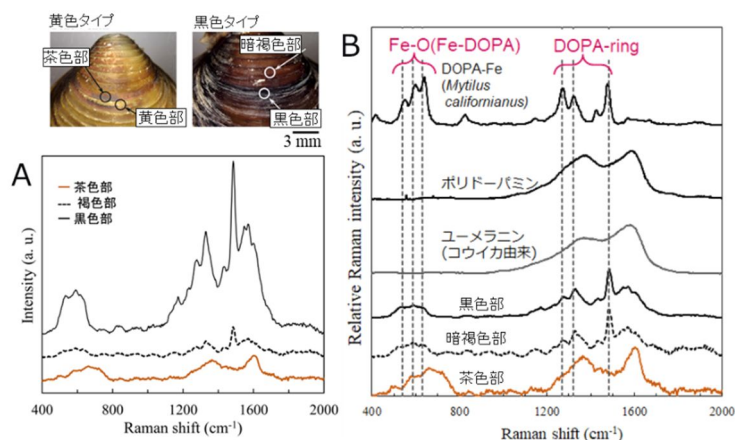


図 5 黒色タイプと黄色タイプのシジミのラマンスペクトル (A) と、黒色タイプと黄色タイプのシジミ、ユーメラニン、*Mytilus californianus* の糸クチクラ (M. J. Harrington, *et al.*, J. Proc. Natl. Acad. Sci., 108(2011) 2651–2655 より改編) およびポリドーパミン (M. T. Cortés, *et al.*, J. Chem. Educ. 96 (2019) 1250–1255 より改編) の規格化したラマンスペクトル

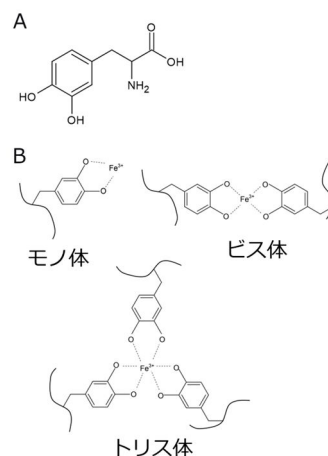


図 6 DOPA の化学構造 (A) と DOPA-Fe 錯体の化学構造 (B)

(2) 黒色化のメカニズム

貝全体を酸処理して得られた殻皮の自己支持膜の色は黒色から黄色になったが、殻皮を保護して得た殻皮膜の色は処理前と変わらなかった(図 7)。

ATR-IR スペクトル解析から、殻皮はタンパク質と炭水化物で構成されていることがわかった。また、ATR-IR と O の K 吸収端 XAFS の解析から、殻皮にチロシンとその誘導体が含まれていることがわかった。シジミの外套膜縁で DOPA を酸化する酵素の活性が確認された。これは、DOPA はこの酵素のはたらきによりチロシンから合成されることを示している。

シジミの殻皮は、チロシン残基から合成された DOPA が反応性の高いキノン系の化合物に変換し、キノンが基質の主鎖を架橋することで形成されたことがわかった。このとき、DOPA が Fe と結合すると Fe-DOPA 錯体が形成する。3 個の DOPA が Fe したトリス体は紫色を示すことから、シジミの殻の黒色化は、黄色の殻皮に黄色の補色である紫色の DOPA-Fe 錯体が形成されたことで起こるとわかった。

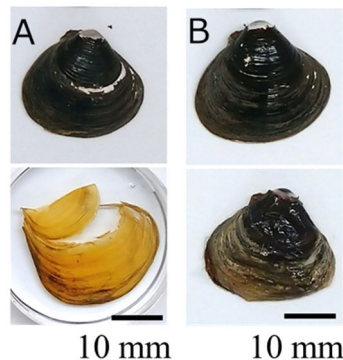


図 7 黒タイプの殻皮膜
A: 処理前(上), 貝全体を酸処理(下)
B: 処理前(上), 殻皮を保護して酸処理

(3) DOPA-Fe 錯体の形成メカニズムと水環境との関係

以上の結果から、Fe-DOPA 錯体の形成メカニズムについて検討し、次のような結論に至った。

初め、カテコール基を含む溶液が酸性 pH 下で細胞外へ分泌される。カテコール基の自己酸化が約 pH5 で開始するが、反応速度は pH8 を超えると著しく増大する。シジミが、溶存酸素濃度が飽和濃度状態にある塩基性(約 pH8)の自然水で生息しているとき、カテコール基は直ちに酸化され、初期殻皮が形成される。初期殻皮が形成されると、初期殻皮で囲まれた空間に分泌細胞から可溶性タンパク質を多く含む分泌液が供給される。ここに自然水が拡散すると、初期殻皮近傍でカテコール基の酸化と架橋が進行する。よって、分泌液の供給終了後も、キノンが無くなるまで架橋は進行することになる。このとき、DOPA が Fe と結合すると Fe-DOPA 錯体が形成する。

Fe は溶存酸素濃度の高い自然水中では第二鉄の形で存在する。そのような水環境では無機第二鉄の溶解度が低い。このため、溶存態の Fe の大部分は、腐植物質などの有機物と結合した有機 Fe 錯体として存在している。DOPA のカテコール基は、強力なキレート剤であることから溶存有機 Fe 錯体が殻皮内に拡散すると、カテコール基と配位子交換が起こり、Fe-DOPA 錯体が形成される。

これより、シジミが生息する水の pH は 殻の色を決定する重要な要素であることがわかった。黄色の殻のシジミは pH8 以上の水環境に生息し、それ以外の色の殻のシジミは pH8 以下の塩基性の水環境に生息してきたと予測される。しかし、溶存有機 Fe 錯体の濃度が低い環境では、pH8 以下の水中でも貝殻の色は黄色を維持すると予測される。DOPA は pH 依存性の鉄キレート特性を示す。pH が上昇すると、着色した Fe-DOPA 錯体の配位状態がモノ体およびビス体からトリス体へと変化する。これより、貝殻の色は、Fe-DOPA 錯体の配位状態と量に依存することになる。これは、黄色を帯びたシジミは砂地で、黒色を帯びたシジミは泥地で育つ傾向にあるという経験的な知見とも一致する。これらの結果は、シジミの貝殻の色から生息環境の履歴を読み出すことができる可能性を示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuniko Takemoto, Masataka Murakami, Masao Tabuchi, Toshiaki Ohta	4. 巻 215
2. 論文標題 Spectroscopic studies for identifying the chemical states of the periostracum of the Corbicula species in Lake Biwa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Structural Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsb.2023.107944	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹本邦子
2. 発表標題 シジミの貝殻の色を決定する殻皮の分光学的手法による分析
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本邦子
2. 発表標題 X A F S 法による琵琶湖産シジミの殻中の黒色物質の同定
3. 学会等名 第36回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本邦子, 村上昌孝, 馬場大哉
2. 発表標題 共鳴ラマン分光法によるシジミの殻皮黒色原因物質同定
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kuniko Takemoto, Masataka Murakami, Masao Tabuchi, Daiya Bamba, Toshiaki Ohta
2. 発表標題 Characterization of the Iron Metallome of Corbicula Species in Lake Biwa
3. 学会等名 Goldschmidt2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本邦子, 村上昌孝, 田淵雅夫, 馬場大哉, 太田俊明
2. 発表標題 分光法によるシジミの殻の色を決める因子の解明
3. 学会等名 日本貝類学会令和 5年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 竹本 邦子	4. 発行年 2024年
2. 出版社 株式会社アグネ技術センター	5. 総ページ数 -
3. 書名 琵琶湖集水域の環境メタロミクス 元素で知る地域環境	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関